

Neue maßanalytische Mikro-bestimmungsmethode der Harnsäure im Harn und Blut.

Von

Stefan Rusznyák und Ella Hatz.

(Aus der Medizinischen Klinik der Kgl. Ung. Franz Josef Universität,
Szeged, Ungarn.)

(Eingegangen am 30. November 1932.)

Zur Bestimmung der Harnsäure werden in der klinischen Praxis zahlreiche Verfahren verwendet. Während die Ausführung der älteren Methoden größere Substanzmengen in Anspruch nahm, gelang es in neuerer Zeit, zuverlässliche Mikromethoden zu schaffen, so daß auch das Blut ohne Bedenken zu den Harnsäurebestimmungen herangezogen werden konnte. Von diesen teils maßanalytischen¹, teils kolorimetrischen² Harnsäurebestimmungsmethoden erfreuen sich besonders die letzteren einer allgemeinen Anwendung.

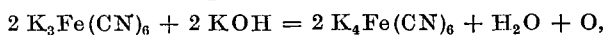
Die allbekannte Erfahrung jedoch, daß bei kolorimetrischen Messungen Fehler subjektiver Herkunft sich oft zu stark geltend machen, veranlaßte uns, die Konzentration des Farbstoffs der der kolorimetrischen Messung unterworfenen Lösung maßanalytisch zu bestimmen. Dabei wurde selbstverständlich danach gestrebt, daß die Beobachtung des Farbenumschlages durch nennenswerte Fehler subjektiver Art nicht beeinflußt werde. Es gelang uns auch tatsächlich, eine maßanalytische Methode auszuarbeiten, bei welcher der Farbenumschlag aus der Entfärbung der die Lösung blau färbenden Komponente besteht, also die Farbenänderung sich ungefähr derart gestaltet, wie bei den jodometrischen Messungen. Unser Verfahren ermöglicht die Bestimmung der Harnsäure mit großer Sicherheit bis zur Genauigkeit von $\pm 0,01$ mg.

¹ Z. B. Krüger u. Schmidt, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**, 2677, 1899; Zeitschr. f. physiol. Chem. **18**, 351, 1894; **45**, 1, 1905; Folin-Schaffer, ebenda **32**, 552, 1901 usw.

² Folin u. Wu, J. of biol. Chem. **38**, 459, 1919; Benedict u. Franke, ebenda **52**, 387, 1922; Folin-Benedict, ebenda **54**, 153, 1922.

Wie bekannt, beruht die kolorimetrische Bestimmung der Harnsäure auf der Beobachtung, daß Phosphorwolframsäure auf Einwirkung von Harnsäure zu einer intensiv blauen Verbindung reduziert wird¹. Über die Konstitution dieses blauen Reduktionsproduktes finden wir in der Literatur keine sicheren Angaben. Es ist jedoch mit ziemlicher Bestimmtheit anzunehmen, daß hier eine analoge Verbindung wie bei dem Oxyd des Molybdäns, welches durch reduktive Einwirkung gewisser organischer Substanzen auf Phosphormolybdänsäure aus dieser entsteht, vorliegt. Da diesem die Formel $\text{Mo}_2\text{O}_5 \cdot 3 \text{MoO}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ entspricht², kann der analogen Wolframverbindung die Formel $\text{W}_2\text{O}_5 \cdot 3 \text{WO}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ zugeteilt werden. Es ist jedenfalls zweifellos, daß das intensiv blaue Reduktionsprodukt ein niedrigeres Oxyd des Wolframs darstellt, das auf oxydative Einwirkung wiederum in das höhere Oxyd des sechswertigen Wolframs (WO_3) übergeht. In wässrigen Lösungen sind selbstverständlich die entsprechenden Hydrate, d. h. Wolframsäuren anzunehmen. Das Reaktionsschema des Oxydationsvorganges kann wie folgt angegeben werden: $2 \text{W}_2\text{O}_5 \cdot 3 \text{WO}_3 + \text{O}_2 = 10 \text{WO}_3$.

Bei unserem Verfahren wird diese Oxydation in alkalischem Medium mittels Kaliumferricyanid durchgeführt. Letzteres liefert in alkalischem Medium 1 Äquivalent Sauerstoff im Sinne der Gleichung:



woraus folgt, daß 1 Mol $\text{W}_2\text{O}_5 \cdot 3 \text{WO}_3$ 2 Mol Kaliumferricyanid äquivalent ist.

Wenn wir nun wüßten, wieviel Mol Harnsäure die Entstehung von 1 Mol $\text{W}_2\text{O}_5 \cdot 3 \text{WO}_3$ hervorruft, könnte die 1 Mol Harnsäure äquivalente Menge des Kaliumferricyanids ohne weiteres ermittelt werden. Leider steht uns aber die Kenntnis des stöchiometrischen Verhältnisses zwischen Harnsäure und $\text{W}_2\text{O}_5 \cdot 3 \text{WO}_3$ nicht zur Verfügung, da — unseres Wissens — der Verlauf der Reaktion zwischen Harnsäure und Phosphorwolframsäure bisher noch nicht aufgeklärt wurde.

Um nun die zur Berechnung der Analyse nötigen Grundlagen zu schaffen, muß der Weg der Empirie eingeschlagen werden, d. h. wir müssen uns auf Daten solcher Analysenreihen stützen, die an reinen Harnsäurelösungen ausgeführt wurden. Der so gewonnene Faktor stellt — wie wir weiter unten sehen werden — keinen im üblichen Sinne des Wortes genommenen empirischen Faktor dar, da zwischen der Menge der bei der Reduktion verbrauchten Harnsäure und dem bei der Rückoxydation verbrauchten Kaliumferricyanid ein strenges stöchiometrisches Verhältnis besteht.

Wir wollen das oben Gesagte mit der Wiedergabe der Berechnungsart des Faktors näher beleuchten: Nehmen wir vorläufig an, daß 1 Mol

¹ Folin u. Wu. l. c.

² F. Ephraim, Anorg. Chem., Dresden u. Leipzig 1929, S. 413; H. Remy, Lehrb. d. anorg. Chem. 2, 121, Leipzig 1931.

Harnsäure 1 Mol $W_2O_5 \cdot 3 WO_3$ bildet. Dann wären 168,04 g (1 Gramm-mol) Harnsäure 2 Liter/Mol Kaliumferricyanidlösung äquivalent, 1 ccm mol/100 Kaliumferricyanidlösung entspräche also 0,8402 mg Harnsäure. Berechnet man nun die Analysen, welche an reinen Harnsäurelösungen verschiedener Konzentration ausgeführt wurden, mit Hilfe dieses Faktors, so machen die gefundenen Werte genau das Dreifache der theoretischen Werte aus. Aus diesen Versuchsergebnissen folgt also, daß die richtige Äquivalenzzahl ein Drittel des oben vorausgesetzten Faktors ist, d. h. 0,2800 gleichgesetzt werden muß. Es läge nahe, aus diesem Experimentalbefund auf den Verlauf der zwischen Harnsäure und Phosphorwolframsäure stattfindenden Reaktion zu schließen, wenigstens was das stöchiometrische Verhältnis zwischen Harnsäure und Reduktionsprodukt anlangt. Diese Folgerung kann jedoch nur dann ohne Bedenken gezogen werden, wenn die Zusammensetzung des Reduktionsproduktes sicher der Formel $W_2O_5 \cdot 3 WO_3$ entspricht. In diesem Falle bildet 1 Mol Harnsäure 3 Mol $W_2O_5 \cdot 3 WO_3$.

Das Prinzip der Ausführung unserer Bestimmungsmethode kann kurz wie folgend zusammengefaßt werden: Die aus Harn abgeschiedene und entsprechend gelöste Harnsäure bzw. das entsprechend enteiweißte Blut wird in Gegenwart von Natriumcyanid mit Natriumcarbonat und Phosphorwolframsäure versetzt. Wie ersichtlich, ist der verfolgte Vorbereitungsvorgang mit demjenigen des von *Folin* und *Wu*¹, *Folin* und *Benedikt*² usw. ausgearbeiteten kolorimetrischen Verfahrens identisch. Die durch das Reduktionsprodukt blau gefärbte Lösung wird nach Zugabe von Lauge mittels mol/100 bzw. mol/200 Kaliumferricyanidlösung bis zur vollständigen Entfärbung titriert.

Experimenteller Teil.

Nötige Reagenzien.

1. *Silberlactatlösung*³. 25 g Silberlactat, 25 g Milchsäure und 25 ccm 10 %ig. Natronlauge werden in 450 ccm dest. Wassers gelöst.

2. *Natriumcyanidlösung*⁴. Man löst 50 g Natriumcyanid in 700 ccm dest. Wassers, trägt in die Lösung 300 g Carbamid ein und schüttelt 4 bis 5 Minuten lang mit 5 g Calciumoxyd gut durch. Nun wird filtriert und im Filtrat das überschüssige Calciumhydroxyd mit Dinatriumhydrophosphat abgeschieden. Man filtriert die Lösung vom Niederschlag ab.

3. 20 %ig. *Natriumcarbonatlösung*, nicht älter als 2 Wochen.

4. *Natriumphosphorwolframatlösung*⁵. 100 g Natriumwolframat werden in 200 ccm dest. Wassers gelöst und nachher unter fortwährendem Schütteln und Kühlen mit 20 ccm 85 %ig. Phosphorsäure versetzt. Nachdem man

¹ l. c.

² l. c.

³ *Folin* u. *Wu*, l. c.

⁴ *Folin*, J. of biol. Chem. 86, 179, 1930.

⁵ *Derselbe*, ebenda 86, 179, 1930.

durch die Lösung 20 Minuten hindurch einen langsamen Strom von Schwefelwasserstoff geleitet hat, führt man abermals 10 ccm Phosphorsäure ein. Nun wird filtriert, wobei die ersten 40 ccm des Filtrats nochmals auf das Filter gegossen werden. Das klare Filtrat wird im Scheidetrichter mit 300 ccm Alkohol versetzt, gründlich durchgeschüttelt, nach kurzem Stehen die untere Flüssigkeitsschicht in einem 500-ccm-Kolben abgelassen und mit dest. Wasser zu 300 ccm ergänzt. Nachdem man die Lösung zwecks Verreiben des Schwefelwasserstoffs kurze Zeit lang gekocht hat (bis ein im Dampfraum gehaltenes Bleiacetatpapier nicht mehr gebräunt wird), werden abermals 20 ccm Phosphorsäure eingeführt und hernach 1 Stunde lang im gelinden Sieden erhalten. Die so gewonnene grüne Lösung wird mit einigen Tropfen Brom entfärbt und der Überschuß des Broms durch Kochen vertrieben. Inzwischen übergießt man 12 g Lithiumcarbonat mit 150 ccm dest. Wasser und führt unter Umschütteln portionsweise 20 ccm Phosphorsäure ein. Nach Auskochen der Kohlensäure wird die Lithiumphosphatlösung abgekühlt und mit der früher gewonnenen Phosphorwolframsäurelösung vereinigt. Das Volumen der Lösung wird mit dest. Wasser zu 1 Liter ergänzt.

5. 10 %ig. Natronlauge.

6. $m/100$ und $m/200$ Kaliumferricyanidlösung. 3,292 bzw. 1,646 g Kaliumferricyanid pro anal. werden im 1-Liter-Meßkolben genau zu 1 Liter gelöst. Falls kein zuverlässiges Präparat zur Verfügung steht, verfährt man folgenderweise: Man löst 16,46 g Kaliumferricyanid im Meßkolben zu 500 ccm. Diese Lösung entspricht einer $m/10$ Lösung, aus welcher durch 10- bzw. 20fache Verdünnung (Pipette und Meßkolben!) eine $m/100$ bzw. $m/200$ Lösung erhalten werden kann. Der Titer der Meßlösungen wird an der $m/10$ Stammlösung ermittelt, und zwar wie folgt¹: Man pipettiert 20 ccm $m/10$ Lösung in einen 100-ccm-Meßkolben, macht mit verdünnter Kalilauge stark alkalisch, kocht auf und versetzt die Lösung solange mit einer frisch bereiteten konzentrierten Ferrosulfatlösung, bis der Niederschlag schwarz wird. Man kühlt ab und ergänzt mit dest. Wasser bis zur Marke. Die den Niederschlag enthaltende Lösung wird durch ein trockenes Faltenfilter in einen trockenen Becher filtriert und 50 ccm des klaren Filtrats, nach starkem Ansäuern mittels verdünnter Schwefelsäure, mit $n/10$ Kaliumpermanganatlösung titriert. Die verbrauchten Kubikzentimeter der Kaliumpermanganatlösung ergeben mit 10 dividiert den Faktor der Kaliumferricyanidlösung, d. h. die bei der Harnsäure verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter der Kaliumferricyanidlösung sind stets mit dieser Zahl zu multiplizieren. Da die Kaliumferricyanidlösungen nicht längere Zeit unzersetzt haltbar sind, möchten wir vorschlagen, die Meßlösungen aus einer $m/10$ Stammlösung frisch zu bereiten und gleichzeitig — wie oben angegeben — eine Titerstellung vorzunehmen. Zur Enteiweißung des Blutes nötige Reagenzien:

7. 10 %ig. Natriumwolframatlösung.

8. $\frac{2}{3}n$ Schwefelsäure. Man verdünnt 35 ccm konz. Schwefelsäure zu 1 Liter Wasser

Bestimmung der Harnsäure im Harn.

1 ccm Harn werden im Zentrifugenröhrchen mit 3 ccm Wasser verdünnt und mit 6 ccm Silberlactatreagens (1.) versetzt. Nachdem das Gemisch

¹ Treadwell, Analyt. Chem. 2, 540.

einige Minuten im Dunklen gestanden hat, wird zentrifugiert. Man überzeugt sich durch Hinzufügen einiger Tropfen Silberlactatlösung, ob die Abscheidung der Harnsäure vollständig verlief. Ist dies nicht der Fall, wird nochmals zentrifugiert. Nun saugt man die klare Lösung vorsichtig ab und löst den Niederschlag durch Umrühren mit einem dünnen Glasstab in 7,5 ccm Natriumcyanidlösung (2.) auf. Das Zentrifugenröhrchen wird außen am Rande dünn eingefettet, der Inhalt in einen 100-ccm-Meßkolben entleert, zweimal mit je 5 ccm 20 %ig. Natriumcarbonatlösung (3.), hierauf mit 5 ccm dest. Wassers ausgespült und zu den vereinigten Lösungen noch 3 ccm Natriumcarbonatlösung gegeben. Die Menge der vorgeschriebenen Natriumcarbonatlösung ist strengstens einzuhalten! Nachdem man die alkalische Lösung mit 5 ccm Phosphorwolframsäure (4.) versetzt hat, wird 20 Minuten lang stehengelassen. Man ergänzt mit dest. Wasser bis zur Marke, schüttelt gründlich durch und pipettiert 50 ccm in einen Titrierkolben. Nach Zufügen von 15 ccm 10 %ig. Natronlauge (5.) wird mit m/100 Kaliumferri-cyanidlösung *sofort* titriert.

Bestimmung der Harnsäure im Blute.

Zur Gewinnung des Blutfiltrates wird die Methode von *Folin* angewendet. Wir bekannt, verwendet man nach dieser Methode zur Verhinderung der Gerinnung Lithiumoxalat. Man gewinnt letzteres durch portionsweises Eintragen einer berechneten Menge von Lithiumcarbonat in Oxalsäurelösung, worauf die Lösung verdampft wird. Man wägt 6 mg des so gewonnenen Lithiumoxalats in einen 50-ccm-Kolben ein und entnimmt aus der Vene etwa 6 ccm Blut. Der Inhalt des Kolbens wird gründlich durchgeschüttelt und nachher 5 ccm Blut daraus entnommen, welches man in einen 100-ccm-Meßkolben pipettiert. Man hämolysiert nun mit 35 ccm Wasser, versetzt mit 5 ccm 10 %ig. Natriumwolframatlösung (7.) und läßt aus einer Bürette unter starkem Umschütteln 5 ccm $\frac{2}{3}$ n Schwefelsäure zutropfen. Nach zehnminütigem Stehen wird mit dest. Wasser bis zur Marke ergänzt und die Lösung durch ein trockenes Faltenfilter in einen trockenen Becher filtriert. 50 ccm des klaren Filtrats werden in einen 100-ccm-Meßkolben pipettiert und 7,5 ccm Natriumcyanidlösung (2.), 15 ccm Natriumcarbonatlösung (3.) und 5 ccm Natriumphosphorwolframatlösung (4.) hinzugefügt. Nach 20minütigem Stehen wird mit dest. Wasser bis zur Marke ergänzt und gründlich durchgeschüttelt. Man pipettiert 50 ccm der so gewonnenen Lösung in einen Titrierkolben, macht mit 15 ccm 10 %ig. Natronlauge alkalisch und titriert *sofort* mit m/200 Kaliumferri-cyanidlösung.

Die Berechnung.

- a) *Bei Harn* wird folgende Formel der Berechnung zugrunde gelegt:

$$\text{Harnsäure mg/100 ccm Harn} = 200 \cdot a \cdot f \cdot 0,28,$$

wo „a“ die Kubikzentimeterzahl der verbrauchten m/100 Kaliumferri-cyanidlösung und „f“ den Faktor dieser Meßlösung bedeutet.

- b) *Bei Blut* rechnet man nach folgender Formel:

$$\text{Harnsäure mg/100 ccm Blut} = 80 \cdot a \cdot f \cdot 0,14,$$

wo die Bedeutung der Buchstaben dieselbe ist wie bei a), mit dem Unterschied, daß hier „a“ die Kubikzentimeterzahl einer m/200 Kaliumferri-cyanidlösung und „f“ den Faktor dieser Meßlösung bedeutet.

Wir haben unser Verfahren vor allem an aus Harnsäure pro anal. bereiteten Stammlösungen ausprobiert. Die Reinigung der Harnsäure wurde auf das sorgfältigste durchgeführt und zwar so, daß wir ein *Mercksches* Präparat in reinster verdünnter Natronlauge lösten und mit reinster verdünnter Salzsäure wiederum ausfällten. Dieses Verfahren wurde dreimal wiederholt und die so gewonnene Harnsäure auf einer Nutsche mit destilliertem Wasser salzsäurefrei bzw. natriumchloridfrei gewaschen. Dieses Präparat wurde schließlich aus viel destilliertem Wasser umgelöst, mit Wasser, dann mit Alkohol gründlich gewaschen und im Vakuum über Chlorcalcium getrocknet. Außer den an reinen Harnsäurelösungen ausgeführten Analysen wurde auch der Harnsäuregehalt von verschiedenen Blut- und Harnproben bestimmt und die Bestimmungen nach Hinzufügen verschiedener Mengen Harnsäurestammlösungen abermals durchgeführt. Es ist stets darauf zu achten, daß die zur Bestimmung gelangende Harnsäuremenge 0,1 bis 2,0 mg betrage, sich also zwischen denselben Grenzen bewegt wie bei der Kolorimetrie.

Tabelle I.

0,01 %ig. Harnsäurelösung ccm	m/100 $K_3[Fe(CN)_6]$ - Lösung ccm	Gef. Harnsäure mg	Ber. Harnsäure mg	Abweichung mg
4	1,44	0,403	0,400	+ 0,003
5	1,80	0,504	0,500	+ 0,004
5	1,78	0,500	0,500	0,000
8	2,86	0,801	0,800	+ 0,001
10	3,60	1,008	1,000	+ 0,008
10	3,53	0,990	1,000	- 0,010
10	3,63	1,017	1,000	+ 0,017
15	5,29	1,480	1,500	- 0,020
15	5,40	1,512	1,500	+ 0,012

0,01 %ig. Harnsäurelösung ccm	m/200 $K_3[Fe(CN)_6]$ - Lösung ccm	Gef. Harnsäure mg	Ber. Harnsäure mg	Abweichung mg
1	0,71	0,099	0,100	- 0,001
1	0,72	0,100	0,100	0,000
2	1,44	0,201	0,200	+ 0,001
2	1,46	0,204	0,200	+ 0,004
2	1,40	0,196	0,200	- 0,004
3	2,20	0,308	0,300	+ 0,008
3	2,10	0,294	0,300	- 0,006
3	2,18	0,305	0,300	+ 0,005
4	2,92	0,408	0,400	+ 0,008
4	2,98	0,417	0,400	+ 0,017

Tabelle II.

Sub- stanz	m/100 $K_3[Fe(CN)_6]$ cem	I. gef. Harn- säure mg	Zugefügte Harnsäure mg	m/100 $K_3[Fe(CN)_6]$ cem	II. gef. Harn- säure mg	Ber. Harn- säure mg	Ab- weichung mg
1 cem Harn	2,44 2,46 2,33	0,684 0,688 0,652	0,200 0,200 0,200	3,12 3,20 3,04	0,874 0,890 0,851	0,884 0,888 0,852	-0,010 +0,002 -0,001

Sub- stanz	m/200 $K_3[Fe(CN)_6]$ cem	I. gef. Harn- säure mg	Zugefügte Harnsäure mg	m/100 $K_3[Fe(CN)_6]$ cem	II. gef. Harn- säure mg	Ber. Harn- säure mg	Ab- weichung mg
1,25 cem Blut *	0,625 0,33 0,56	0,0875 0,0462 0,0784	0,025 0,025 0,025	0,80 0,53 0,92	0,1120 0,0742 0,1288	0,1125 0,0712 0,1284	-0,0005 +0,003 +0,0004

* Man verwendet zur Bestimmung 5 cem Blut. Zur Titration gelangt jedoch das durch die in 1,25 cem Blut befindliche Harnsäure gebildete Reduktionsprodukt.

Wie aus den oben angeführten Tabellen ersichtlich, liefert unsere Methode recht befriedigende Resultate, bei denen die maximale Abweichung von den theoretisch ermittelten Werten 0,01 mg nicht überschreitet.